

結核菌素皮膚試驗

張振田、黃瑞明

衛生署胸腔病院

摘要

結核菌素皮膚試驗 (tuberculin skin test, TST) 的主要功能為偵測患者是否感染結核菌，其臨床應用已將近一百年，然而，TST 的判讀至今仍有不少爭論的地方。

結核菌素的材料、製造廠商，以及結核菌素給予的技術，判讀的時間、方法、及判讀人員的經驗都是影響 TST 結果的重要因素。目前為止，PPD(purified protein derivative)是唯一被接受的結核菌素材料，TST 假如以使用生物可用率等量(bioequivalence)與 STU PPD-S 相同的結核菌素，並以皮內注射的 Mantoux method 紿予可能最恰當。同時，建議在結核菌素給予 48 小時至 72 小時後判讀，而且，TST 應判讀腫(induration)而非紅(erythema)。

TST 偽陰性反應的原因可分技術(technical)方面跟生物學(biological)方面，技術方面的原因包括結核菌素的材料、TST 的給予方式、以及判讀的方法。生物學方面的原因，包括病毒感染、細菌或黴菌感染、結核病、惡性腫瘤、免疫抑制劑治療、年齡、及其他因素。

造成 TST 偽陽性的主要原因則為卡介苗接種及非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)，因為卡介苗及 NTM 的抗原和結核菌抗原很相似，因此容易產生交互反應(cross reaction)。另外，重複執行 TST 可能會增加反應的大小，導致反應增加的原因有非特異性變化、boosting、或 conversion。

民國 95 年 12 月 15 日受理；民國 96 年 2 月 02 日接受刊載

通訊作者：張振田；聯絡地址：台南縣仁德鄉中山路 864 號

e-mail：hk9867@ms23.hinet.net

另一個代替 TST 的方法為干擾素檢測法(IFN- γ assay)，新一代的干擾素檢測法以 ESAT-6 (early secreted antigen target 6)與 CFP-10 (culture filtrate protein 10)為抗原，可以排除 BCG 以及大部份的 NTM 干擾，使其特異性大為提高，目前的產品有 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB。整體而言，目前 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 尚無法全面取代 TST，但針對特定族群的結核菌感染，使用 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 可以減少 TST 所造成的偽陽性和偽陰性。

TST 只是一種試驗，主要用於偵測結核菌感染，不能當作活動性結核病的診斷方法，因此，TST 的用處端賴臨床情境及族群而定。

關鍵詞：結核菌素皮膚試驗

緣起

結核菌素皮膚試驗 (tuberculin skin test, TST) 雖然歷史久遠，臨床應用已將近一百年，然而，始料未及的，TST 的判讀至今仍有不少爭論的地方。

結核菌素一開始是由 Robert Koch 所製備的，Robert Koch 將養在小牛肉湯(veal broth)內的結核菌加熱殺死及過濾後，再將過濾液(filtrate)蒸發濃縮至原來體積的十分之一，這個就是最早的結核菌素(old tuberculin, OT) [1]。Robert Koch 原打算利用結核菌素作為治療結核病的利器，但是後來發現並不成功，於是只得放棄。然而，1907 年 von Pirquet 却意外發現結核菌素具有偵測患者是否感染結核菌的功能，感染結核菌的小孩經結核菌素皮膚注射後，注射部位出現直徑約 5-20mm 大小的丘疹(papule)，未感染結核菌的小孩則無此現象[2]。

由於 old tuberculin 的製備相當簡陋，有人甚至以巫婆湯戲稱，後來的研究也發現 old tuberculin 品質不穩定而且特異性不高，主要原因是過濾液所含的成份太複雜，於是，1934 年 Dr. Florence Seibert 加以改良，利用合成的營養物質培養結核菌，再用高壓蒸汽滅菌，然後萃取其中的蛋白質成份，經

過這樣純化後得到的結核菌素稱為 PPD (purified protein derivative)，其穩定度及特異性隨即大為提升，之後，1939 年 Dr. Florence Seibert 再將結核菌素標準化並製備大批結核菌素備用，這樣的結核菌素稱為 PPD Standard 或 PPD-S，從此國際間同意所有進行皮膚試驗的結核菌素生物可用率等量 (bioequivalence) 須與 PPD Standard 相同，結核菌素最後一次的改良為添加 Tween，Tween 是一種清潔劑，可以將玻璃或塑膠對結核菌素蛋白質的吸附降到最低，因此，可以延長保存期限並改善結核菌素試驗的再現性[1,2]。

結核菌素皮膚試驗的技術

A. 執行技術

結核菌素的材料、製造廠商，以及結核菌素給予的技術都會影響 TST 的結果。目前為止，PPD 是唯一被接受的結核菌素材料，雖然商用結核菌素從 1TU 到 250TU 都有，但是，劑量太低則敏感度不足，劑量太高則特異性不夠。1908 年，Mantoux 發明結核菌素皮內注射的方法，稱為 Mantoux test。TST 的給予方式除了皮內注射的 Mantoux method 外，尚有 patch test 和 multipuncture techniques (Tine test)，比較起來，patch test 不夠精確，multipuncture techniques 的敏感度和再現性則較差[2, 3,4]，因此，Mantoux test 至今仍是 TST 最廣泛使用的方法。綜上所述，TST 假如以使用生物可用率等量與 5TU PPD-S 相同的結核菌素，並以皮內注射的 Mantoux method 紿予可能最恰當[1]。目前，北美洲有兩大結核菌素製造廠商，Connaught laboratories (Tubersol) 以及 Parke-Davis (Aplisol)。在歐洲，the Serum State Institute of Copenhagen, Denmark 製造的結核菌素稱為 RT-23，RT-23 目前已被 WHO 接受為標準的結核菌素且在北美洲以外的地區廣泛使用，研究顯示，2TU 的 RT-23 與 5TU 的 PPD-S 比較起來雖然在特異度(specificity)上稍差，但在敏感度(sensitivity)上則差不多[5]。

結核菌素假如不慎注射到皮下，反應會較強烈，不易判讀[6]。使用較細

的針頭注射則結核菌素可能外漏，容易出現偽陰性[7]。注射的部位雖然以前臂掌側較方便，但其它部位也可以。

B.判讀技術

判讀的時間、方法、及判讀人員的經驗都是影響 TST 結果的重要因素，結核菌素給予後的反應可以在 6 小時到七天之間出現，但 6 小時的反應屬於非特異性反應，且大部份活動性結核病患在 48 小時 至 72 小時呈現陽性反應，因此，目前 TST 建議在結核菌素給予 48 小時至 72 小時後判讀[8]。

當結核菌素注入皮內數小時後，注射部位可觀察到單核球細胞(mononuclear cells)浸潤的現象，隨著時間增加，發炎反應會越來越厲害，因而在 1-4 天內導致注射部位紅腫(erythema and induration)現象，這些單核球細胞主要成員為單核球/巨噬細胞(monocytes/macrophages)及 T 淋巴球(T-lymphocytes)細胞，但也有一部份為多核性顆粒球(polymorphonuclear granulocytes)細胞。少數情況下注射部位只有單核球細胞浸潤而摸不到腫(induration)的現象，此現象稱為 pseudoanergy，其原因尚不清楚[2,9]。

TST 應判讀腫(induration)而非紅(erythema)，其判讀方法有觸摸(palpation)法，以及原子筆法(ballpoint method)，兩者比較起來，ballpoint method 較快，較敏感，較穩定[10,11]。病患自己判讀可能出現錯誤，不同判讀人員的誤差應在 2mm 內。

C.不良反應

TST 的不良反應很少，當然，任何注射皆可能出現 vaso-vagal 反應，異位性體質的人可能出現立即性的 wheal and flare，強陽性反應的人可能出現淋巴管炎導致注射部位出現水皰甚至潰爛，少有 anaphylaxis 的患者出現，而目前為止，懷孕並非 TST 的禁忌[12]。

偽陰性反應

偽陰性反應的原因可分技術(technical)方面跟生物學(biological)方面，技

術方面的原因包括結核菌素的材料、TST 的給予方式、以及判讀的方法，已如前述，是較容易克服的。生物學方面的原因則較不易避免，包括病毒感染、細菌或黴菌感染、結核病、惡性腫瘤、免疫抑制劑治療、年齡、及其他因素[1]。

活動性結核病患 TST 偽陰性較易出現在重度結核病患[13]、營養不良[14]、及腎功能不好的情形[15]。人類免疫缺陷病毒(HIV)感染是另一個 TST 偽陰性出現的重要原因，同時感染 HIV 及結核菌的病患當 CD4 淋巴細胞大於 400-500 時 其偽陰性為 15-28%，當 CD4 淋巴細胞小於 200 時其偽陰性可達 100%[16,17]。然而，雖然 HIV-seropositive 病患的陽性反應減少，其反應的型態並未改變，換言之，當 HIV-seropositive 病患的 CD4 淋巴細胞逐步下降時其陽性反應病人數目逐步減少，但 TST 之皮膚紅腫程度並無逐步減小的現象，這意謂 TST 比較像是一個全有或全無的現象(all- or- nothing phenomenon)，免疫力下降到臨界點時將喪失 TST 陽性反應[18,19]。

另一個 TST 偽陰性出現的重要原因是年齡，當年齡超過 65 歲時其陽性反應病人數目隨著年齡增加逐步減少，但結核菌素試驗之反應強度一樣並無逐步減小的現象[20,21]。

Anergy 是另一個 TST 偽陰性出現的重要原因，臨床上幾乎所有健康民眾對於 mumps, candida, diphtheria or tetanus 抗原試驗皆有反應，因此，假如受試者對於 mumps, candida, diphtheria or tetanus 抗原試驗皆有反應而對於 TST 出現陰性，則認定其為真陰性(true negative)，假如受試者對於 mumps, candida, diphtheria or tetanus 抗原試驗皆無反應，而對於 TST 出現陰性，則認定其為 anergy 導致的偽陰性，但有一點要注意即是 anergy 試驗結果可能隨著時間而改變[22]。

偽陽性反應

BCG:

全世界每年出生的嬰兒約 88% 接種卡介苗(bacille Calmette-Guerin, BCG)，卡介苗接種 4-8 個星期後大部份接種者的 TST 即會轉為陽性，雖然 TST 會受製造廠商、劑量、結核菌素給予的技術、以及卡介苗菌種影響，然而 TST 陽轉率未達 90% 之疫苗即會被淘汰，因為之前認為 TST 陽轉代表宿主對於結核菌感染的免疫保護力，但是隨後的研究發現卡介苗接種後的 TST 反應與其保護效果並無直接相關，但是目前並無其他替代方法[23]。

雖然 TST 在卡介苗接種 4-8 個星期後即會陽轉，但是其反應程度將隨著時間增加逐步減弱，假如嬰兒時期接種卡介苗，通常會在五年內陰轉，這意謂嬰兒時期免疫系統尚未成熟[1,24,25]。如年齡較大後才接種卡介苗，經過十年，15-25% 的人 TST 仍有反應，而且其結核菌素試驗之反應強度與結核菌感染的人一樣，並無減小的現象[1]。

非結核分枝桿菌(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

NTM 存在環境中的土壤和水，尤其是潮溼溫暖的環境中，雖然 NTM 致病力低，但仍會對人造成疾病，包括肺部及淋巴結感染。之前的研究發現全世界已有相當比例人口至少對一種 NTM 抗原敏感[1]，NTM 抗原雖然也被用來診斷 NTM 感染，但不同研究間敏感度及特異性變異很大，而且 NTM 抗原也還未標準化，因此，目前還未被常規使用[26]。由於 NTM 抗原和結核菌抗原很相似，因此容易產生交互反應(cross reaction)而造成偽陽性，然而，NTM 造成偽陽性的干擾程度端視各地區對於 NTM 敏感的頻率及結核病之盛行率而定，假如 NTM 敏感的頻率穩定，則結核病之盛行率越低，NTM 造成偽陽性的干擾程度越高，如此，TST 之陽性反應標準(cut-point of positive test)需要提高才能改善特異性[27]。

結核菌素皮膚試驗結果判讀

TST 陽性的盛行率在未接種卡介苗的北美洲差異很大，一般而言，學齡兒童及年輕人盛行率很低，但在郊區的窮人、靜脈藥物注射者、領取社會救濟者、遊民、及老年人則特別高，另一個盛行率高的族群則是活動性結核病

患的接觸者[1]。

假如受試地區 NTM 的敏感頻率穩定，則結核病之盛行率越低，NTM 造成偽陽性的干擾程度越高，對於篩選來說，則其陽性預測值(positive predictive value)低。反之，結核病之盛行率高之地區、痰抹陽性病患的密切接觸者、或結核病高盛行率地區之移民，其陽性預測值較高，BCG 及 NTM 的影響可被忽略[1]。

TST 是否陽性的判讀僅是評估的一部份，接下來更重要的是評估試驗陽性者發病的風險，然而，試驗陽性者發病的風險在不同族群卻有很大的不同，甚至，某些族群試驗陽性者發病的風險比另一方族群試驗陰性者發病的風險還低。雖然 TST 主要用於偵測結核菌感染，不能當作活動性結核病的診斷方法，然而，當病患臨床資料(如症狀、胸部 X 光病灶、或痰抹片檢查)高度懷疑活動性結核病時，此時，TST 將提供重要的診斷參考[1]。

重複執行 TST 可能會增加反應的大小，導致反應增加的原因有非特異性變化、boosting、或 conversion，非特異性變化是由於結核菌素給予方式、判讀技術、及反應的微小差異所導致，綜合這些因素得到的結果其標準差約 2-3mm，因此，95%TST 試驗者的隨機變異導致反應增加的大小應小於 6mm(也就是兩個標準差)[1]。

假如反應增加的大小超過 6mm 以上則應視為生物現象(biological phenomenon)，原因有兩種可能，即 boosting、或 conversion，意指原先 TST 陰性但新的 TST 為陽性。boosting 指回復以前的免疫反應，而無新的感染。conversion 意指新的結核菌、NTM 感染、或 BCG 接種所引起的免疫反應，兩者在臨床上有很大的差異，boosting 的年發病風險僅 0.05%，而 conversion 的年發病風險高達 4-6% [1]。

Boosting phenomenon 可在多年前被分枝桿菌敏感化的族群出現，於 1955 年首先在 BCG vaccination 的接種者發現，一般相信 boosting phenomenon 的發生是因為在第一次結核菌素皮內注射時血液循環中敏感化的淋巴球細

胞太少，因此，無法在局部產生足夠的反應，然而，隨著第一次結核菌素皮內注射造成血液循環中的敏感化的淋巴球細胞快速增加，第二次結核菌素皮內注射將引起較大的反應[1]。boosting phenomenon 最明顯的反應時段約在第一，二次結核菌素皮膚試驗間隔 1 到 5 星期之間，假如間隔僅 48 小時或超過 60 天則其反應較不明顯，然而，其反應可持續至兩年[1,28]。在老年人，boosting phenomenon 則可能在第四次 TST 才出現[29]。

Boosting 的定義有很多爭議，簡單而實際的定義是只要第二次 TST 的 induration 等於或大於 10mm 就算是陽性，接種卡介苗及 NTM 敏感化族群易出現 boosting phenomenon。分辨 boosting 或 conversion 是很重要的，因為這牽涉到是否需要預防性治療的問題，臨牀上可以利用 two-step TST 方法加以區別。假如反應時段在第一，二次 TST 間隔 1 到 5 星期之間，可視為 boosting phenomenon[30]。假如反應時段約在接種卡介苗，或結核菌暴露之後，可視為 conversion。根據研究，感染後，TST 約需 19 到 57 天(3-8 星期)才會 conversion (window period)。另外，假如反應出現在二階段 TST 陰性之後也可視為 conversion。但，許多情況下 boosting 或 conversion 是很難分辨的[1]。

另類結核菌素試驗(干擾素檢測: IFN- γ assay)

另一個代替 TST 的方法為干擾素檢測法(IFN- γ assay)，干擾素檢測法主要原理為，TST 所誘發的遲發型過敏反應(delayed type hypersensitivity reaction)屬於細胞媒介型免疫反應(cell mediated immune response)，而由 T 細胞產生的干擾素正是結核菌感染時宿主細胞媒介型免疫反應主要的細胞激素，利用結核菌抗原在體外刺激受試者的血液，經 incubation 後檢測產生干擾素的反應可作為是否感染結核菌的依據[31]。根據此免疫反應現象，目前在臨牀上應用的主要血液檢測方法有兩種，第一種為全血干擾素檢測法(whole-blood IFN- γ assay)，此法開始於 1985 年，1991 年首先用於牛隻結核菌感染的檢測，1997 年開始用於人結核菌感染的檢測[32]。全血干擾素檢測法原本以 PPD 為

抗原，其缺點為無法排除 BCG 與 NTM 的干擾，新一代的全血干擾素檢測法以 ESAT-6 (early secreted antigen target 6)與 CFP-10 (culture filtrate protein 10)為抗原，因為這兩種抗原屬結核菌 RD1 部位的基因產物，為結核菌及少數 NTM 所特有，可以排除 BCG 以及大部份的 NTM 干擾，使其特異性大為提高[33,34]，目前上市的產品有 QuantiFERON-TB Gold (Cellestics, Carnegie, Australia)。另一血液檢測方法為，以 ESAT-6/CFP-10 刺激血液後，再以 ELISPOT 方法檢測分泌干擾素的 T 細胞數目，作為是否感染結核菌的依據。目前上市的產品為 T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) [35]。上述兩種血液檢測方法的優點為只需就診一次，不受判讀人員差異或 boosting phenomenon 的干擾，可同時檢測數種分枝桿菌抗原，另一個優點為兩者具有 internal positive control，可減少偽陰性的機率。雖然，整體而言，目前 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 與 TST 在檢測 latent TB infection 有很好的一致性(agreement)，但仍有部份接觸者檢查呈現 TST 反應陽性而 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 檢測陰性的情形。臨床研究顯示，針對接種過 BCG 的族群，QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 的特異度較 TST 來得高。之前的研究已知道某些因素較易讓 TST 出現偽陰性，針對免疫功能受抑制的族群，QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 也都較易出現中間值(intermediate results)的結果，但是，QuantiFERON-TB Gold 的機率比 T-SPOT.TB 來得高[36]。有研究報告顯示，針對 5 歲以下的小孩子同時合併 HIV 感染的活動性結核病患，T-SPOT.TB 的敏感度較 TST 來得好，而且較不受 malnutrition 影響[37]。由於資料還不夠充分，上述兩種血液檢測方法孰優、孰劣，目前尚無法判斷，但顯示 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 在臨床應用上有不一樣的地方。整體而言，目前 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 尚無法全面取代 TST，但針對特定族群的結核菌感染，使用 QuantiFERON-TB Gold 和 T-SPOT.TB 可以減少 TST 所造成的偽陽性和偽陰性，對於結核病的防治是有幫助的[36]。

7. 結論：

TST 只是一種試驗，主要用於偵測結核菌感染，不能當作活動性結核病的診斷方法，因此，TST 的用處端賴臨床情境及族群而定。重複 TST 時應考慮 boosting phenomenon 和 anergy 的影響。以 ESAT-6 與 CFP-10 為抗原的干擾素檢測法特異性較高，也較不受 boosting phenomenon 影響。雖然 TST 仍有一些爭論的地方，未來，新的分子生物技術將幫忙我們對 TST 有更多的瞭解。

參考文獻

1. Reichman LB., Hershfield ES. Tuberculosis. A Comprehensive International Approach. Second Edition, Revised and Expanded., New York: Marcel Dekker, 2000; 279-322. 343-43.
2. William N.Rom, Stuart M. Garay. Tuberculosis. Second Edition., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 837-42.
3. Biggs,B, Connor,H, Dwyer,BW, et al. Comparison of a multiple puncture tuberculin test, 'Imotest', and the Mantoux test in an Australian population. *Tubercle*. 1987; 68: 285-90.
4. Research Committee of the British Thoracic Association. Reproducibility of the Tine tuberculin test. *Br. J. Dis. Chest.* 1982; 76: 75-78.
5. Comstock GW, Edwards LB, Philip RN, et al. A comparison in the United States of America of two tuberculins, PPD-S and PPD-RT 23. *Bull WHO.* 1964; 31: 161-70
6. Rhoades,ER. and Bryant,RE. The influence of local factors on the reaction to tuberculin. 1. The effect of injection. *Chest.* 1980; 77: 190-93.
7. Flynn,PM., Shene,J.L., Mao,L., et al. Influence of needle gauge in Mantoux skin testing. *Chest.* 1994; 106: 1463-65.
8. Geneva: World Health Organization. The WHO Standard Tuberculin Test. 1963.

9. Beck,J.S. Skin changes in the tuberculin test. *Tubercle*. 1991; 72: 81-7.
10. Sokal,J.E. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N. Engl. J. Med.* 1975; 293: 501-2.
11. Jordan,TJ, Sunderam,G, Thomas,L., et al. Tuberculin reaction size measurement by the pen method compared to traditional palpation. *Chest*. 1987; 92: 234-36.
12. Snider,D. Pregnancy and tuberculosis. *Chest*. 1984; 86: 10S-13S.
13. Howard, WL, Klopfenstein,M.D., Steininger,WJ, et al. The loss of tuberculin sensitivity in certain patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 1970; 57: 530-34.
14. Kardjito,T, Donosepoetro,M, and Grange,JM. The Mantoux test in tuberculosis: correlations between the diameters of the dermal responses and the serum protein levels. *Tubercle*. 1981; 62: 31-5.
15. Selroos,O, Pasternack,A, and Virolainen,MSkin test sensitivity and antigen-induced lymphocyte transformation in uraemia. *Clin. Exp. Immunol.* 1973; 14: 365-70.
16. Graham,NM, Nelson,KE, Solomon,L, et al. Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and -seronegative intravenous drug users. *JAMA*. 1992; 267: 369-73.
17. Markowitz,N, Hansen,NI, Wilcosky,TC, et al. Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119: 185-93.
18. Diagbouga,S, Fumoux,F, Ledru,E,et al. Lack of direct correlation between CD4 T-lymphocyte counts and induration sizes of the tuberculin skin test in human immunodeficiency virus type 1 seropositive patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1998; 2: 317-23.
19. Gourevitch,M.N., Hartel,D., Schoenbaum,EE, et al. Lack of association of induration size with HIV infection among drug users reacting to tuberculin.

- Am. J. Respir. Crit Care Med. 1996; 154: 1029-33.
20. Yokoyama,T., Rikimaru,T., Gohara,R., et al. [Tuberculosis in elderly]. Kekkaku. 2003; 78: 479-482. [In Japanese: English abstract]
21. Battershill,J.H. Cutaneous testing in the elderly patient with tuberculosis. Chest. 1980; 77: 188-9.
22. Kniker,WT, Anderson,CT, McBryde, JL, et al.. Multitest CMI for standardized measurement of delayed cutaneous hypersensitivity and cell-mediated immunity. Normal values and proposed scoring system for healthy adults in the U.S.A. Ann. Allergy. 1984; 52: 75-82.
23. Fine,PE, Sterne,JA, Ponnighaus, M, et al. Delayed-type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. Lancet. 1994; 344: 1245-49.
24. Grindulis,H., Baynham,MI, Scott,PH, et al. Tuberculin response two years after BCG vaccination at birth. Arch. Dis. Child. 1984; 59: 614-19.
25. Pabst,H.F. and Kreth,HW. Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease. J. Pediatr. 1980; 97: 519-34.
26. Huebner,RE, Schein,MF, Cauthen,GM, et al. Evaluation of the clinical usefulness of mycobacterial skin test antigens in adults with pulmonary mycobacterioses. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1992; 145: 1160-66.
27. American Thoracic Society Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1990; 142: 725-35.
28. Cauthen,G.M., Snider,DE, Jr, and Onorato,IM Boosting of tuberculin sensitivity among Southeast Asian refugees. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1994; 149: 1597-600.
29. Van den,B.P. and Demedts,M. Four-stage tuberculin testing in elderly subjects induces age-dependent progressive boosting. Chest. 1992; 101: 447-50.
30. Bass,JA, Jr. and Serio,R.A. The use of repeat skin tests to eliminate the booster phenomenon in serial tuberculin testing. Am. J. Respir. Crit Care Med.

1981; 123: 394-96.

31. Andersen,P, Munk,ME, Pollock,JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000; 356: 1099-104.
32. Wood,P.R. and Jones,S.L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis. (Edinb.). 2001; 81: 147-55.
33. Mori,T., Sakatani,M., Yamagishi,F., et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am. J. Respir. Crit Care Med. 2004; 170: 59-64.
34. Brock,I, Weldingh,K, Lillebaek,T, et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am. J. Respir. Crit Care Med. 2004; 170: 65-9.
35. Wagstaff,A.J. and Zellweger,J.P. T-SPOT.TB: an in vitro diagnostic assay measuring T-cell reaction to *Mycobacterium* tuberculosis-specific antigens. Mol. Diagn. Ther. 2006; 10: 57-63.
36. Ferrara,G, Losi,M, D'Amico,R., et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium* tuberculosis: a prospective study. Lancet. 2006; 367: 1328-34.
37. Liebeschuetz,S, Bamber,S, Ewer,K, et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. Lancet. 2004; 364: 2196-2203.